

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ THÙY

PHÂN LẬP ĐOẠN GEN *CYP79D1* LIÊN QUAN ĐẾN
SỰ TỔNG HỢP HYDROGEN CYANIDE CỦA CÂY Sắn
(*MANIHOT ESCULENTA*)

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ THÙY

**PHÂN LẬP ĐOẠN GEN *CYP79D1* LIÊN QUAN ĐẾN
SỰ TỔNG HỢP HYDROGEN CYANIDE CỦA CÂY Sắn
(*MANIHOT ESCULENTA*)**

Ngành: DI TRUYỀN HỌC

Mã số: 8 42 01 21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn khoa học: TS. Hoàng Phú Hiệp

THÁI NGUYÊN - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan nội dung trình bày trong luận văn là kết quả nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn trực tiếp của TS. Hoàng Phú Hiệp. Các số liệu, kết quả sử dụng trong luận văn là trung thực và được sự đồng ý của cán bộ hướng dẫn cùng nhóm nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những kết quả nghiên cứu trong luận văn này.

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Thùy

LỜI CẢM ƠN

Em xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Hoàng Phú Hiệp đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và chỉ bảo để em có thể hoàn thành luận văn này.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy cô, cán bộ Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục Sinh học, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tận tình giúp đỡ em trong quá trình làm luận văn.

Em xin bày tỏ lời cảm ơn sự động viên và giúp đỡ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề luận văn.

Trong quá trình nghiên cứu, do thời gian và khả năng có hạn, luận văn còn nhiều hạn chế. Em rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến của thầy cô và các bạn.

Thái Nguyên, tháng 09 năm 2018

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Thùy

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
BẢNG CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cây sắn (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	3
1.1.1. Phân loại, nguồn gốc và phân bố của cây sắn	3
1.1.2. Đặc điểm cây sắn.....	4
1.1.3. Hướng sử dụng sản phẩm từ sắn	6
1.1.4. Tình hình sản xuất - tiêu thụ sắn tại Việt Nam.....	8
1.2. Độc tố trong sắn.....	11
1.3. Họ gen <i>CYP79</i> và tình hình nghiên cứu gen <i>CYP79D1</i> và <i>CYP79D2</i>	14
1.3.1. Đặc điểm họ gen <i>CYP79</i>	14
1.3.2. Tình hình nghiên cứu gen <i>CYP79D1</i> và <i>CYP79D2</i>	16
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Vật liệu và địa điểm nghiên cứu.....	18
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	18
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu.....	18
2.2. Thiết bị và hóa chất	18
2.3. Phương pháp nghiên cứu	19

2.3.1. Phương pháp tách chiết RNA tổng số	19
2.3.2. Phương pháp tạo cDNA.....	20
2.3.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số	20
2.3.4. Phương pháp PCR	20
2.3.5. Phương pháp điện di sản phẩm PCR	22
2.3.6. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR.....	22
2.3.7. Phương pháp đọc trình tự	23
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	24
3.1. Kết quả tách chiết RNA, tạo cDNA và nhân đoạn gen <i>CYP97D1</i>	24
3.2. Kết quả tách chiết DNA và nhân đoạn gen <i>CYP97D1</i>	25
3.3. Xác định và phân tích trình tự đoạn gen <i>CYP79D1</i> của 2 giống sắn Xanh Vĩnh Phú và KM94.....	26
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	31
1. Kết luận.....	32
2. Đề nghị.....	32
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	33

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

STT	VIẾT TẮT	VIẾT ĐẦY ĐỦ
1	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
2	cDNA	Complementary deoxyribonucleotide acid
3	CYP	Cytochrome P450
4	DNA	Deoxyribonucleotide acid
5	FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
6	HCN	Hydro cyanua
7	IAA	β - Indole acetic acid
8	IAOx	Indole - 3 - acetaldoxime
9	PCR	Polymerase Chain Reaction
10	ppm	Parts per million
11	RNA	Ribonucleotide acid

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của tinh bột sắn.....	7
Bảng 1.2. Sản lượng sắn theo vùng của Việt Nam giai đoạn 2000-2015	9
Bảng 1.3. Nồng độ cyanide trong sản phẩm thức ăn từ sắn	12
Bảng 1.4. Họ gen CYP79 ở thực vật	14
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR	21
Bảng 2.2. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR.....	22

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Phân bố và sản lượng sản ở các nước trên thế giới (2013)	4
Hình 1.2. Sản lượng sản cả nước giai đoạn 1995-2016.....	8
Hình 1.3. Quá trình chuyển hóa HCN từ lá sản xuống củ.....	15
Hình 3.1. Kết quả tách chiết RNA tổng số	24
Hình 3.2. Kết quả PCR nhân đoạn gen <i>CYP79D1</i> từ RNA tổng số	24
Hình 3.3. Kết quả điện di DNA tổng số	25
Hình 3.4. Kết quả PCR nhân đoạn gen <i>CYP79D1</i>	
Hình 3.5. So sánh bằng đồ họa về trình tự đoạn gen <i>CYP79D1</i>	27
Hình 3.6. Vị trí phân bố của một số gen CYP trên hệ gen sản	31

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Nhóm chất cyanide gồm rất nhiều hợp chất với cấu tạo hóa học phức tạp. Những chất này có trong hơn 2.650 loài thực vật khác nhau thuộc khoảng 550 chi và hơn 130 họ, bao gồm dương xỉ, thực vật hạt kín, cây hạt trần [20]. Nhiều cây ăn được chứa cyanogenic glycosides với nồng độ khác nhau, sự khác biệt chủ yếu do yếu tố di truyền, môi trường, vị trí, mùa và loại đất [6].

Ở Việt Nam, cây sắn đóng góp phần không nhỏ trong công cuộc xóa đói giảm nghèo cho nông dân các vùng thiếu số, vùng sâu vùng xa. Sản phẩm từ sắn được ứng dụng trong nhiều ngành sản xuất: chế biến bột ngọt, bánh kẹo, mì ăn liền, bao bì, phụ gia, màng phủ thực phẩm hay thành phần của ethanol.

Cyanide có mặt trong sắn ở hai dạng cyanogenic glycoside: linamarin và lotaustralin. Trong đó, linamarin chiếm hơn 80% và có mặt trong tất cả các bộ phận của cây sắn, đặc biệt là rễ và lá. HCN tạo ra và tích tụ nhiều ở vỏ, đầu và phần lõi ruột của sắn [24]. Căn cứ vào hàm lượng HCN (hydro cyanua) trong sắn, người ta chia các giống sắn thành 2 nhóm: nhóm sắn ngọt và nhóm sắn đắng. Trong quá trình chế biến sắn, nếu không loại được HCN thì chất này có thể gây ngộ độc cho người và động vật. Khả năng chống chịu hàm lượng HCN của động vật phụ thuộc vào giống, độ tuổi [7]. Để làm giảm hàm lượng HCN trong sản phẩm sắn thường phải thông qua các phương pháp như làm khô; ủ chua để lên men, ngâm nước củ, thân và lá non.

Độc tố trong sắn được phát hiện lần đầu vào năm 1885 bởi Peckolt, có tên gọi là manihotoxin. Quá trình sinh tổng hợp độc tố ở sắn có sự tham gia của enzyme hydrolytic, enzyme này phân giải các dạng cyanogenic glycoside thành dạng cyanide tự do [8]. Như vậy, hàm lượng độc tố trong sắn có thể được giảm bằng cách sử dụng các kỹ thuật knock-out gen hoặc RNAi tác động vào chu trình chuyển hóa đó.